

学位申請論文

α_1 受容体刺激による左室拡張障害の発生に関する検討

—ラット梗塞心による実験的検討—

獨協医科大学 内科学 (心血管・肺)

西 悠

要 旨 Wistar系雄性ラットを用い、心筋梗塞を作製後、慢性期にフェニレフリンによる α_1 受容体刺激をおこなない、左室拡張機能ならびに Ca^{2+} 結合蛋白質アネキシンVの細胞内移動について免疫組織学的に検討した。ラット左冠状動脈前下行枝を結紮し、10-13週間後に、梗塞群 (n = 6) と非梗塞群 (sham-ope群, n = 4) にフェニレフリンを30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{分}$ で、30分間投与した。心拍数、左室収縮期圧 (LVP max)、左室拡張最小圧 (LVP min)、左室拡張末期圧 (LVEDP) を測定し、左室圧一次微分の最大陽性 dP/dt (+ dP/dt)、左室圧一次微分の最大陰性 dP/dt (- dP/dt) を計測した。梗塞群ではフェニレフリン投与後、左室拡張最小圧 ($p < 0.05$)、左室拡張末期圧 ($p < 0.05$) が有意に上昇し、左室拡張障害を惹起した。非梗塞群ではフェニレフリン投与で拡張障害は起こらなかった。梗塞群で梗塞サイズと左室拡張最小圧 ($p < 0.01$)、左室拡張末期圧 ($p < 0.01$)、- dP/dt ($p < 0.001$) は有意な正の相関関係を示した。更に、梗塞心の非梗塞部心筋ではフェニレフリン投与によりアネキシンVの細胞質からの消失、細胞外逸脱を認めた。以上より、慢性梗塞心においては α_1 受容体刺激により容易に拡張障害を起こすこと、その際、アネキシンVの細胞内移動を伴うことが明らかとなった。

Key Words : 心筋梗塞, 左室拡張障害, フェニレフリン, α_1 受容体刺激

緒 言

近年、心不全は収縮不全と拡張不全に分けられ、その病態や治療法、予後が論じられるようになってきた。臨床的には前者は左室駆出率が45-50%未満で心不全症状を有する場合に、後者は左室駆出率が45-50%以上で心不全症状を有する場合に診断される。拡張不全は高齢者や、高血圧、心肥大を有する患者で見られる。以前には拡張不全の予後は収縮不全より良好と考えられてきたが、最近、両者の予後は変わらず、また、全心不全患者の約半数に認められると報告されている¹⁻³⁾。

最近、リアノジン受容体のリン酸化によって、拡張期の筋小胞体から Ca^{2+} が漏出し心不全や悪性不整脈を発生するとの報告がある^{4,5)}。また、我々はカルシウム負荷下でノルエピネフリンを投与すると拡張期拘縮による著しい拡張障害が起こることを報告した⁶⁾。カテコールア

ミンは心筋の収縮、弛緩に密接に関わっている。 β_1 受容体刺激は心筋収縮力を増強させることは知られているが、 α_1 受容体刺激が心機能、特に拡張期の心機能に及ぼす影響についてはほとんど判っていない。本研究は、ラットに陳旧性心筋梗塞を作成し、梗塞心に対する α_1 受容体刺激が拡張障害を起こすか否かを検討した。さらに最近、protein kinase C (PKC) が Ca^{2+} 結合蛋白質アネキシンVと結合することにより、PKCの細胞内でのトランスロケーションを活性化することが報告され⁷⁾、 α_1 受容体刺激によりアネキシンVの細胞内移動が起こるか否かを免疫組織学的に検討した。

実験方法

1. 実験プロトコール

体重260-320g、8-9週雄性ラットを用いた。ラットを購入後、水分、飼料を自由に与え、購入1週間後に実験に使用した。実験は本学実験動物委員会の許可を得て、獨協医科大学の動物実験倫理規定に基づいて行った。

3%イソフルラン (メルク社) を吸入麻酔後、ポリエチレンチューブ (SP102, Natsume社) を気管内挿管し、人工呼吸器 (SN-480-7, シナノ社) を装着した。1.7%

平成19年10月31日受付、平成19年11月26日受理

別刷請求先：西 悠

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林880
獨協医科大学 内科学 (心血管・肺)

イソフルランの吸入麻酔下で、60回/分、1回換気量3mlの呼吸管理をおこなった。左第3肋間で開胸し、心嚢膜を切開後、梗塞群は左冠動脈前下行枝を絹糸（6.0；Ethicon）で完全結紮し、直ちに閉胸した。非梗塞群（sham-ope群）は梗塞群と同じ方法で開胸し、左冠動脈前下行枝に糸をかける操作のみとし、結紮せずに閉胸した。

両群とも、気管内チューブを抜管し覚醒後、飼育室に戻し、上記と同様の環境下で飼育した。ラット11匹に冠動脈結紮を行い、5匹は結紮後24時間以内に死亡した。非梗塞群4匹は死亡しなかった。10-13週間経過後、再度、上記と同様に、麻酔後、気管内挿管した。右総頸動脈から圧測定チップ付カテーテル（2F；SPC-320；ミラー社）を左室内に挿入、また、各種溶液を注入するため、右大腿静脈から試験薬注入用ポリエチレンチューブ（SP10）を挿入し、持続注入器（KDS210；KDS）で各溶液を一定速度で注入した。心電図は四肢に電極を装着し生体アンプ（P55；GRASS Inc.）により第2誘導をモニターした。10分間の血行動態の安定化を図った後、梗塞群と非梗塞群（sham-ope群）に α_1 受容体刺激としてフェニレフリン（30 μ g/kg/分）を30分間投与した。フェニレフリンの投与量は、予め予備実験において、正常ラットの血圧を有意に変化させる量を調べ、決定した。

各群で5分毎に、心拍数、左室収縮期圧（left ventricular systolic pressure；LVP max）、左室拡張最小圧（minimum diastolic pressure；LVP min）、左室拡張末期圧（left ventricular end-diastolic pressure；LVEDP）を測定し、左室圧一次微分の最大陽性dP/dt（+dP/dt）、左室圧一次微分の最大陰性dP/dt（-dP/dt）を算出した。左室拡張末期圧の測定は左室等容収縮期の開始時で、この点が特定できない場合は心電図のR波に一致する圧で測定した⁸⁾。全ての薬剤は5%ブドウ糖に溶解し、注入速度は1分間当たり16.6 μ lとした。実験終了後、屠殺し心臓を摘出し、梗塞の大きさを測定した。

2. 組織標本の作成と心筋梗塞サイズの測定

摘出した心臓を脂肪や結合組織などを除去、10%ホルマリン溶液で48時間固定後中央部で横断し、パラフィン包埋し厚さ3 μ mの切片を作成、型のごとく脱水脱脂後、ヘマトキシリンエオジンとマッソントリクロム染色を行った。

左室中央部の横断切片をコンピューターに取り込み、心筋梗塞の大きさ（梗塞サイズ：%）を以下のSandmannらの方法⁹⁾に準じて求めた（図1）：

$$\text{心筋梗塞サイズ (\%)} = \frac{\{(\text{梗塞外周囲径}a + \text{梗塞内周囲径}b) \div 2\} \div \{(\text{左室外周囲径}c + \text{左室内周囲径}d) \div 2\} \times 100$$

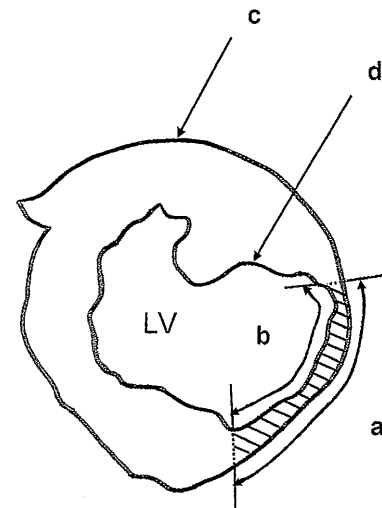


図1 心筋梗塞サイズの測定

心筋梗塞サイズ (%) = $[(a + b)/2] / [(c + d)/2] \times 100$
LV；左心室。

3. アネキシンV心筋免疫組織染色

心筋組織片を20%中性緩衝ホルマリン溶液で固定、パラフィン包埋後、厚さ3 μ mの薄切標本を作製した。3%過酸化水素を含むメタノールに5分間浸し蒸留水で洗浄、ついで10mM PBSでの洗浄後、3%ウシ血清アルブミン（BSA）を含むPBSに更に30分間浸した。3%BSA-PBSで5 μ g/mlに調整した抗ヒト心筋アネキシンVモノクローナル抗体HCA-290を一次抗体として反応させ、DAKO LSABTM2/HRP（DAB）キット（DAKO, Japan）のビオチン標識二次抗体反応後、さらにHRP標識ストレプトアビジンを加えた。同キット付属の発色基質を加えた基質緩衝液で発色させた。免疫組織染色は正常対照心筋、ならびにフェニレフリンを投与されていない陳旧性心筋梗塞ラットの非梗塞部心筋についても検討した。

4. 統計解析

測定値は平均値 \pm 標準偏差で示した。各データの解析はDunnett法、無相関検定によって分散分析（ANOVA）を用いて行い、危険率5%未満を有意差ありとした。

結 果

非梗塞群および梗塞群の組織標本を図2に示す。梗塞は左室前壁に作製され、梗塞サイズは33.2 \pm 5.7%であった。図3に非梗塞群、梗塞群のフェニレフリン投与前、後の各パラメーターの変化を示した。心拍数は非梗塞群、梗塞群でフェニレフリン投与により有意の変化を認めなかった。左室収縮期圧は、非梗塞群、梗塞群で投与10分

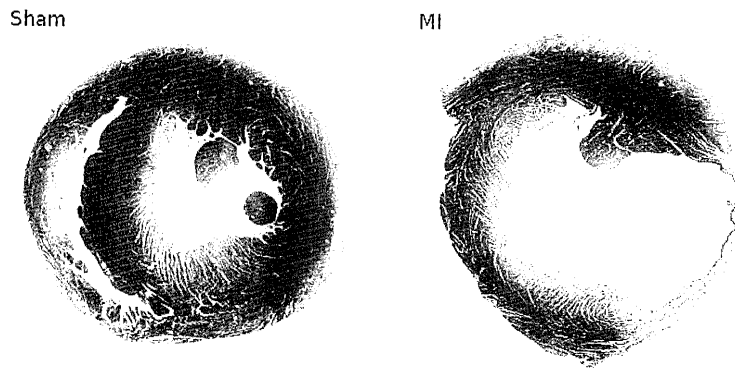


図2 非梗塞心 (sham) 及び梗塞心 (MI) 横断面の病理標本

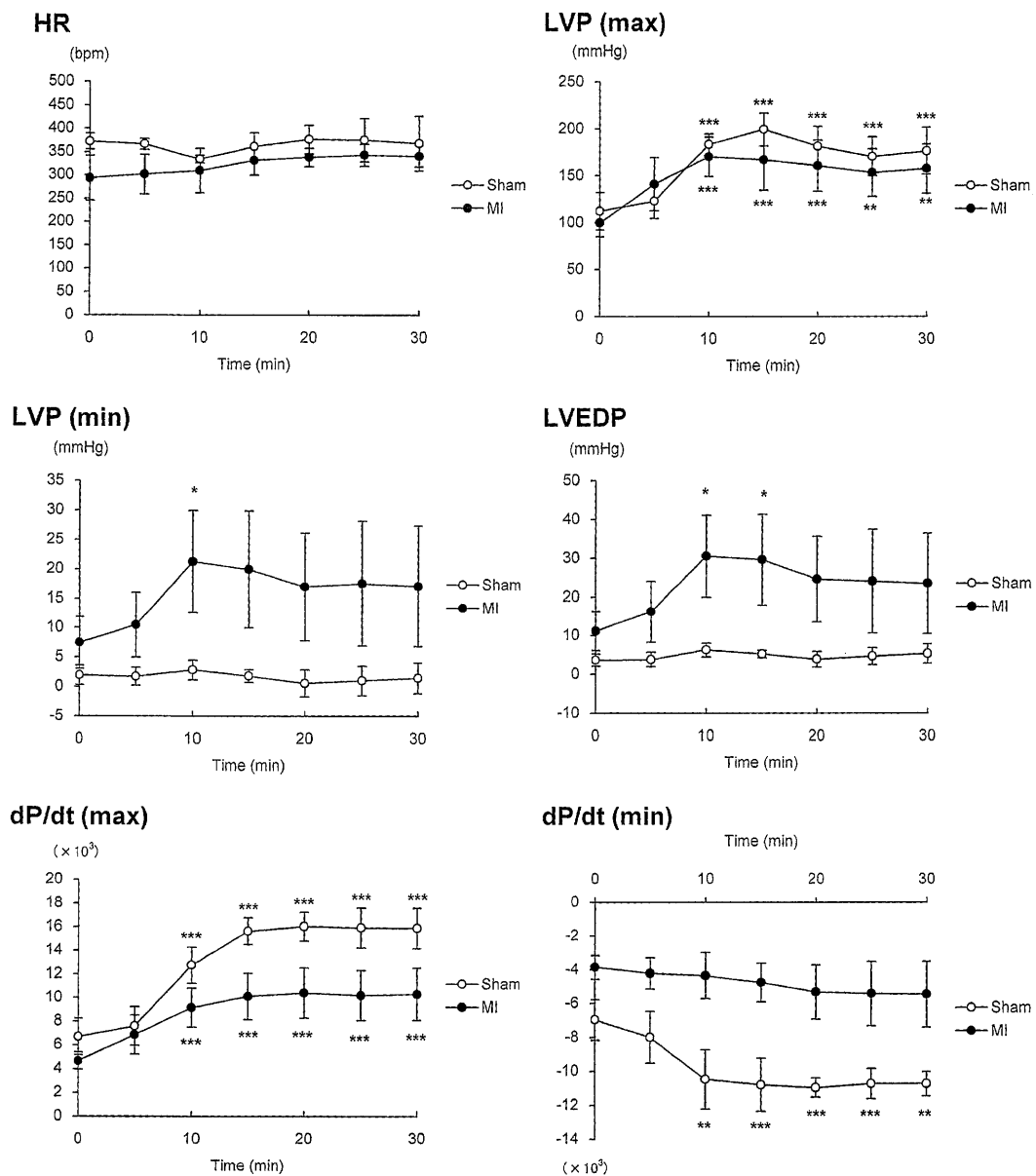


図3 フェニレフリン投与後の非梗塞群 (n = 4) 及び梗塞群 (n = 6) の血行動態
 梗塞群では左室収縮期圧, 左室拡張最小圧, 左室拡張末期圧, dP/dt maxが有意に増加した. 非梗塞群では左室収縮期圧, dP/dt maxが有意に増加し, dP/dt minが有意に大きくなった.
 HR (心拍数), LVP max (左室収縮期圧), LVP min (左室拡張最小圧), LVEDP (左室拡張末期圧). 各群において前値 (0分値) と比較検定した. * ; p < 0.05, ** ; p < 0.01, *** ; p < 0.001.

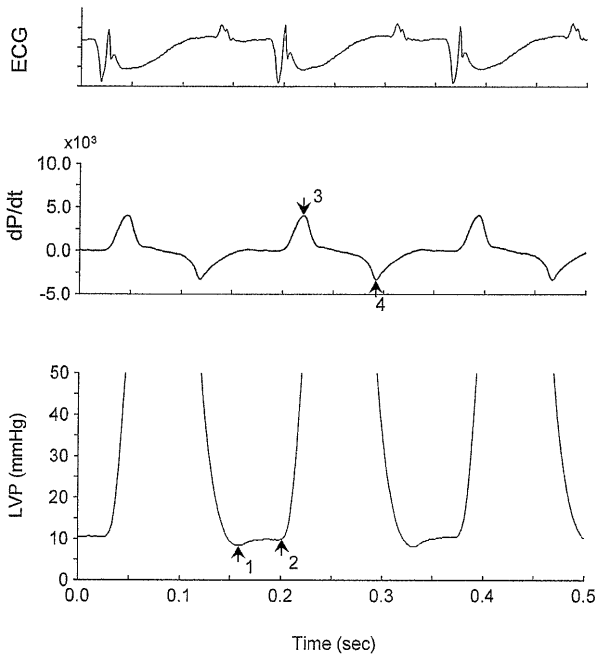


図4 フェニレフリン投与前の梗塞群の左室圧曲線
矢印1は左室拡張最小圧 (8.5 mmHg), 2は左室拡張末期圧 (10 mmHg), 3は+dP/dt (4.002×10^3), 4は-dP/dt (-3.306×10^3)を示す. LVP; 左室圧.

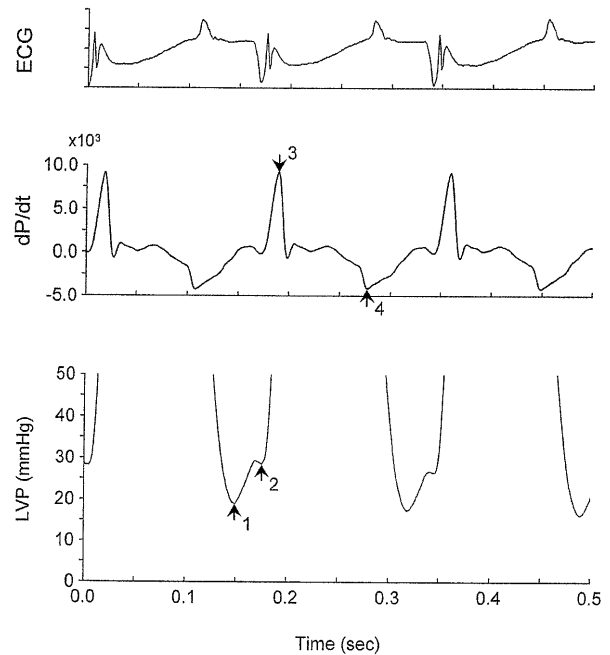


図5 フェニレフリン投与10分後の梗塞群の左室圧曲線
矢印1は左室拡張最小圧 (19 mmHg), 2は左室拡張末期圧 (29.2 mmHg), 3は+dP/dt (9.203×10^3), 4は-dP/dt (-4.084×10^3)を示す. LVP; 左室圧.

以降に有意に増加した. 左室拡張最小圧は梗塞群で投与前 7.4 ± 4.4 mmHg, 投与10分後 21.3 ± 7.8 mmHgと投与前に比べ有意に上昇した ($p < 0.05$). 左室拡張末期圧は梗塞群で投与前 11.1 ± 5.1 mmHgから投与10分後 30.5 ± 10.6 mmHg, 15分後 29.6 ± 11.7 mmHgと有意に上昇した ($p < 0.05$). しかし, 非梗塞群では, 左室拡張最小圧, 左室拡張末期圧は有意な変化を示さなかった. また, +dP/dtは非梗塞群, 梗塞群ともに有意に増加した. -dP/dtは梗塞群では有意な変化はなかったが, 非梗塞群で有意に大きくなった.

図4には梗塞群のフェニレフリン投与前, 図5にはフェニレフリン投与10分後の心電図, dP/dtおよび左室圧の同時記録を示す. フェニレフリン投与により, 左室拡張最小圧, 左室拡張末期圧の著しい上昇を認めた.

フェニレフリン投与10分後の各パラメーターと梗塞サイズとの相関を調べると, 図6に示すように心拍数, 左室収縮期圧は相関を示さなかったが, 梗塞サイズと左室拡張最小圧, 左室拡張末期圧はいずれも正の相関を示し増加した. 一方, 梗塞サイズが大きいほど+dP/dtは減少した. -dP/dtは梗塞サイズが大きいと小さくなった.

アネキシンVは正常対照心筋(図7A)では細胞質全体に認められた. フェニレフリンを投与していない梗塞心の非梗塞部では一部に染色性の低下が見られた(図7B).

非梗塞心でフェニレフリンを投与した群では一部の心筋に染色性の低下が認められたが, 梗塞心でフェニレフリンを投与した群ではアネキシンVが細胞質から消失し(図7C) また, 細胞膜でアネキシンVの濃染および間質への逸脱がみられた(図7D).

考 察

心臓においては神経終末よりノルエピネフリンが分泌され, 主として β_1 受容体作用として, 心筋収縮力の増加, 心拍数の増加をもたらす. 血管平滑筋に対しては α_1 受容体刺激作用により血管収縮を起こすことは周知のことである. しかし, α_1 受容体刺激が心臓に対してどのような影響を与えるのかは十分にはわかっていない.

心臓は一定の心周期を有して収縮, 弛緩, 拡張を行っている. 収縮期は僧帽弁閉鎖から大動脈弁閉鎖まで, 拡張期は大動脈閉鎖から僧帽弁閉鎖までであるが, 収縮期はさらに, 僧帽弁閉鎖から大動脈弁開放までの等容収縮期, 大動脈弁開放から大動脈弁閉鎖までの駆出期に, さらに拡張期は大動脈弁の閉鎖から僧帽弁の開放までの等容弛緩期, 早期血液流入期, 緩徐血液流入期, 心房収縮による血液流入期の4相に分けられる. 拡張障害では早期血液流入, 緩徐血液流入, 心房収縮による血液流入が障害される結果として, -dP/dtの減少や左室最小拡張

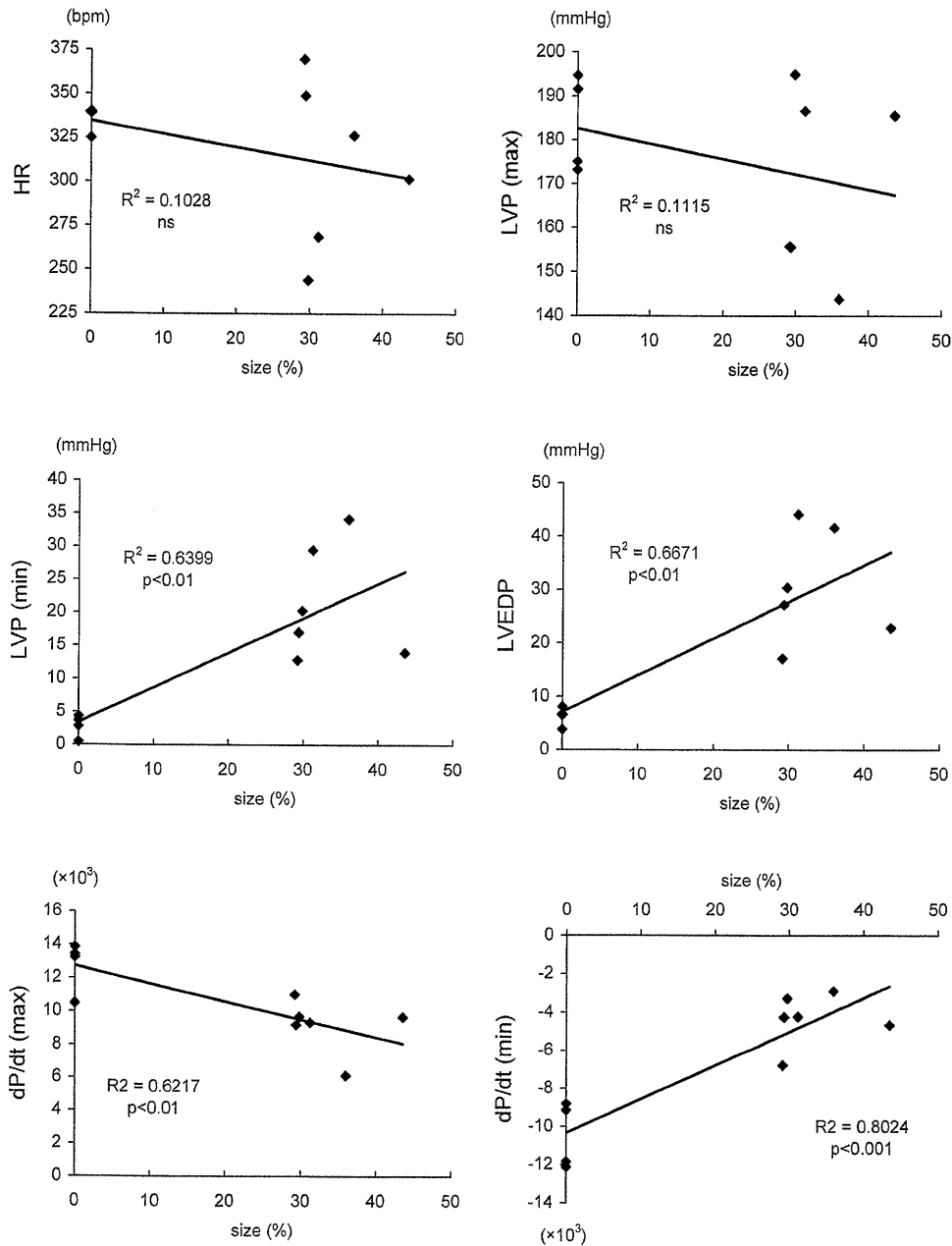


図6 フェニレフリン投与群の梗塞サイズと各パラメーターとの関係

フェニレフリン投与10分後、梗塞サイズ (size) は心拍数、左室収縮期圧と相関を示さなかった。梗塞サイズと左室拡張最小圧、左室拡張末期圧、 $-dP/dt$ は正の相関を示したが、 $+dP/dt$ とは負の相関を示した。

期圧、左室拡張末期圧の上昇などを認める。

本研究では、陈旧性心筋梗塞ラットに α_1 受容体刺激を行い、非梗塞群 (sham-ope群) と比較検討した。その結果、 α_1 受容体刺激により、左室拡張最小圧、左室拡張末期圧の上昇を認めた。これらの変化は非梗塞心では認められなかった。また、非梗塞心では α_1 受容体刺激で認められた $-dP/dt$ の増加は、梗塞心では認められなかった。このことより α_1 受容体刺激により左室拡張障害が起こることが明らかとなった。

すでに狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患において、心不全を有する患者の血漿中ノルエピネフリン濃度が高値であることが知られている。Cohnらは、血中ノルエピネフリン濃度が高い心不全患者は予後不良であると報告した¹⁰⁾。また、左室機能障害のある駆出率が35%以下の無症状の患者において、血中ノルエピネフリン値が高い患者 (393 pg/ml以上) では、それより低い濃度の患者に比べ、全死亡率、心血管死亡率、心不全による入院率、虚血性心疾患イベント率のいずれも有意に高いと報

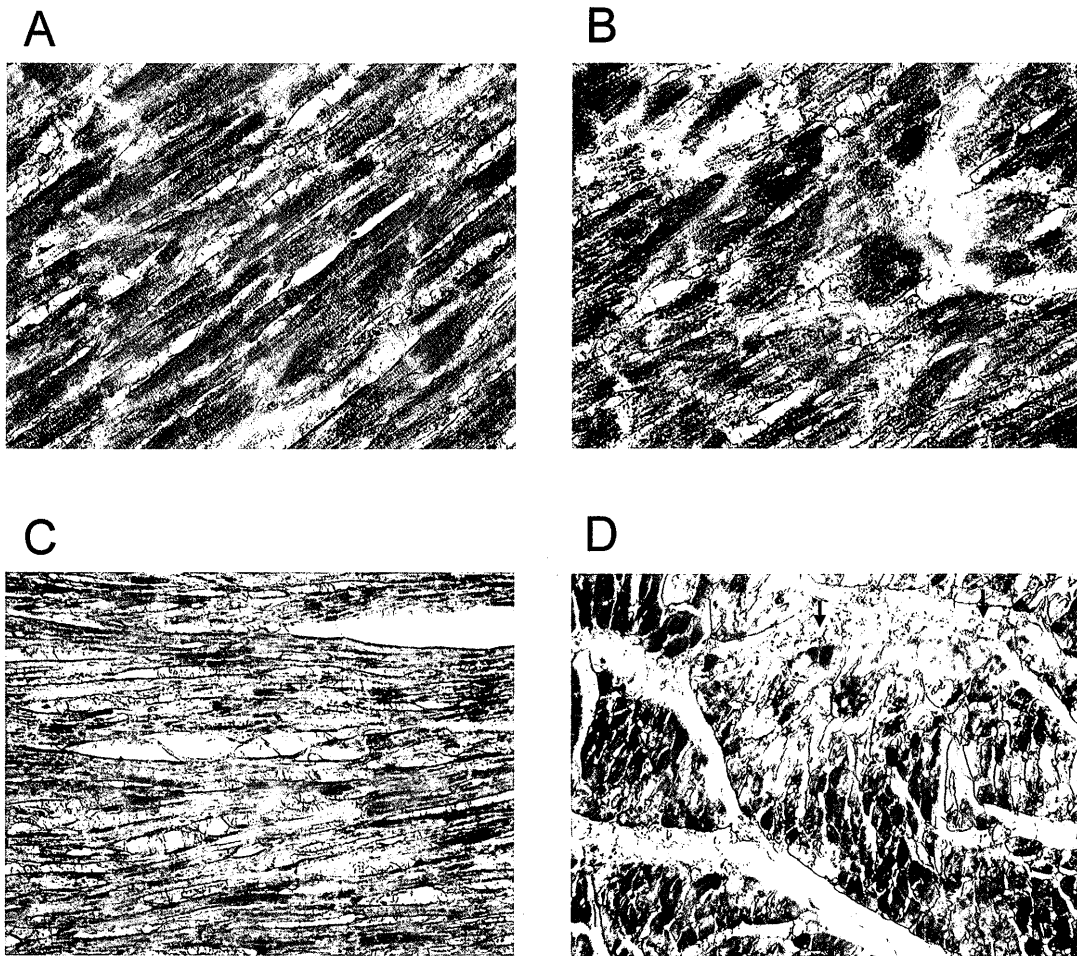


図7 アネキシンV免疫組織染色 (倍率×400)

- A: 正常対照心筋。
 B: フェニレフリン投与していない梗塞心の非梗塞部心筋。一部にアネキシンVの不均一性が見られる。
 C: フェニレフリン投与後の梗塞心の非梗塞部心筋。アネキシンVの細胞質からの消失が認められる。
 D: フェニレフリン投与後の梗塞心の非梗塞部心筋。アネキシンVの細胞膜での濃染ならびに間質への逸脱 (矢印) がみられる。

告している¹¹⁾。血漿ノルエピネフリンの高値は心不全に伴う交感神経の緊張によると理解されてきたが、本研究より、虚血心において α_1 受容体刺激により拡張障害を惹起すると考えられる。

Ca^{2+} 動態は心筋の興奮-収縮連関の基本である。細胞外から流入する Ca^{2+} 増加は筋小胞体膜のリアノジン受容体に作用し、筋小胞体の貯蔵 Ca^{2+} が細胞質内に放出される。最近、 β_1 受容体刺激によるprotein kinaseA (PKA)を介して、リアノジン受容体が過リン酸化されると、リアノジン受容体とFK506結合蛋白質 (FKBP) が解離し、筋小胞体から拡張期に Ca^{2+} 漏出がおこる結果、悪性不整脈や心不全を引き起こすとする報告がある^{4,5)}。しかし、本研究では左室拡張障害が α_1 受容体刺激で起こることを確認した。

何故、 α_1 受容体刺激で拡張障害を惹起するのであろう

か。狭心症や実験的虚血心筋の拡張期拘縮の原因として、細胞内 Ca^{2+} の過負荷が報告されている^{12,13)}。虚血心筋における細胞内カルシウムの過負荷は、細胞内 Ca^{2+} 流入の増加、拡張期の筋小胞体への Ca^{2+} 再摂取 (calcium reuptake) の低下によると考えられている¹⁴⁾。さらに、 α_1 受容体刺激はイノシトールリン脂質代謝系およびPKCを介し、イノシトール1,4,5-三リン酸 (IP_3)を増加させ、これが筋小胞体における Ca^{2+} 放出を促し、細胞内 Ca^{2+} の増加を促進する^{15,16)}。

最近、アネキシンVと α_1 受容体刺激で活性化されるPKCとの関係が明らかになってきた。アネキシンVが δ PKCと結合することにより δ PKCの細胞内でのトランスロケーションを活性化するという⁷⁾。アネキシンVは Ca^{2+} 結合蛋白質、アネキシンファミリーの1つで、 Ca^{2+} 濃度に依存し細胞膜リン脂質ホスファチジルセリンに結

合する性質を有し、4つのドメインからなる。この中央部に Ca^{2+} チャンネルホールが存在する^{17,18)}。Camorsらは、虚血心や不全心での心筋細胞内アネキシンVの局在変化が心筋細胞内 Ca^{2+} ハンドリングや心不全の進行に関与していると報告している¹⁹⁾。本研究において、梗塞心で α_1 受容体刺激によりアネキシンVの細胞質内での移動を確認した。このことは左室拡張障害の発生時に、 δ PKCとアネキシンVがトランスロケーションすることを裏付ける結果と考えられる。 α_1 受容体刺激による左室拡張障害の発生には細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に加えて、アネキシンVの細胞内移動が密接に関連していることが示唆される。

結 論

1. 陳旧性心筋梗塞ラットに α_1 受容体刺激を行い、非梗塞群 (sham-ope群) と対比検討した。その結果、 α_1 受容体刺激を行うと、左室拡張最小圧、左室拡張末期圧の上昇を認めた。これらの変化は非梗塞心では認めなかった。また、非梗塞心では α_1 受容体刺激で認められた $-dP/dt$ の増加は、梗塞心では認められなかった。さらに梗塞サイズと左室拡張末期圧との間に正相関を認めた。
2. 陳旧性心筋梗塞ラットに α_1 受容体刺激を行うと細胞質内アネキシンVの消失、細胞外逸脱が認められた。
3. 以上より、梗塞心では、 α_1 受容体刺激で拡張障害を起こすこと、その際にアネキシンVの細胞内移動を伴うことが明らかになった。

謝 辞 稿を終えるにあたり、本研究のご指導を賜りました獨協医科大学心血管・肺内科学教室、金子昇教授に深甚なる謝意を表します。また、ご協力いただいた心血管・肺内科研究生、篠崎誠氏、並びに浅石理恵氏、教室員の皆様に深謝致します。

文 献

- 1) Gandhi SK, Powers JC, Nomeir A-M, et al. : The pathogenesis of acute pulmonary edema associated with hypertension. *N Engl J Med*, **344** : 17-22, 2001.
- 2) Aronow WS. : Left ventricular diastolic heart failure with normal left ventricular systolic function in older persons. *J Lab Clin Med*, **137** : 316-323, 2001.
- 3) Owan TE, Hodge DO, Herges RM, et al. : Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*, **355** : 251-259, 2006.
- 4) Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, et al. : PKA phos-

phorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor) : defective regulation in failing hearts. *Cell*, **101** : 365-376, 2000.

- 5) Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, et al. : Protection from cardiac arrhythmia through ryanodine receptor-stabilizing protein calstabin2. *Science*, **304** : 292-296, 2004.
- 6) Kaneko N, Matsuda R, Nakajima T, et al. : Norepinephrine-induced diastolic dysfunction with aortic valve opening under calcium-loading in rats. *Drug Dev Res*, **67** : 511-518, 2006.
- 7) Kheifets V, Bright R, Inagaki K, et al. : Protein kinase C δ (δ PKC)-annexin V interaction. A required step in δ PKC translocation and function. *J Biol Chem*, **281** : 23218-23226, 2006.
- 8) Braunwald E. : Ventricular pressure. In "Braunwald's Heart Disease. A textbook of cardiovascular medicine" vol.1. 7th edition ed by Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E. Elsevier Inc., Philadelphia, pp409, 2005.
- 9) Sandmann S, Class R, Cleutjens JPM, et al. : Calcium channel blockade limits cardiac remodeling and improves cardiac function in myocardial infarction-induced heart failure in rats. *J Cardiovasc pharmacol*, **37** : 64-77, 2001.
- 10) Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, et al. : Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med*, **311** : 819-823, 1984.
- 11) Benedict CR, Shelton B, Johnstone DE, et al. : Prognostic significance of plasma norepinephrine in patients with asymptomatic left ventricular dysfunction. *Circulation*, **94** : 690-697, 1996.
- 12) Mohabir R, Lee H-C, Kurz RW, Clusin W. : Effects of ischemia and hypercarbic acidosis on myocyte calcium transients, contraction, and pHi in perfused rabbit hearts. *Circ Res*, **69** : 1523-1537, 1991.
- 13) Meisser A, Morgan JP. : Contractile dysfunction and abnormal Ca^{2+} modulation during postischemic reperfusion in rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **37** : H100-H111, 1995.
- 14) Morgan JP, Emy RE, Allen PD, et al. : Abnormal intracellular calcium handling, a major cause of systolic and diastolic dysfunction in ventricular myocardium from patients with heart failure. *Circulation*, **81** (suppl III) : III-21-III-32, 1990.
- 15) Volders PGA, Vos MA, Szabo B, et al. : Progress in the

- understanding of cardiac early afterdepolarizations and torsades de pointes : time to revise current concepts. *Cardiovasc Res*, **46** : 376-392, 2000.
- 16) Carlsson L. : *In vitro* and *in vivo* models for testing arrhythmogenesis in drugs. *J Int Med*, **259** : 70-80, 2006.
- 17) Kaneko N, Ago H, Matsuda R, et al. : Crystal structure of annexin V with its ligand K-201 as a calcium channel activity inhibitor. *J Mol Biol*, **274** : 16-20, 1997.
- 18) Kaneko N, Matsuda R, Toda M, et al. : Inhibition of annexin V-dependent Ca^{2+} movement in large unilamellar vesicles by K201, a new 1,4-benzothiazepine derivative. *Biochim Biophys Acta*, **1330** : 1-7, 1997.
- 19) Camors E, Monceau V, Charlemagne D. : Annexins and Ca^{2+} handling in the heart. *Cardiovasc Res*, **65** : 793-802, 2005.